

Fibricola seoulensis 웅성생식세포의 투과전자현미경적 미세구조

손운목^{1)*}, 이순형²⁾

인제대학교 의과대학 기생충학교실¹⁾, 서울대학교 의과대학 기생충학교실 및 풍토병연구소²⁾

국문초록: *Fibricola seoulensis*의 고환내 생식세포 및 정자의 미세구조를 관찰하고자 하였다. 실험감염 흰쥐로부터 회수한 총체를 고정, 탈수, 침투, 포매, 중합 등의 통상적인 시료제작 과정을 거친 후 JEM 1200EX-II(JEOL, Japan) 투과전자현미경으로 관찰하였다. 정원세포는 주로 고환의 내벽에서 관찰되었으며 비교적 큰 핵과 상대적으로 적은 세포질을 가지고 있었다. 정모세포는 핵의 양이 세포질 보다 조금 많았고 난형 또는 타원형의 핵을 가지고 있었으며 비교적 염색질의 양이 적었다. 초기의 정자세포는 핵에 비하여 세포질의 양이 훨씬 많았고 핵 주위를 사립체들이 둘러싸고 있었다. 발육이 진전된 정자세포에는 끈 모양의 염색질이 나타났고, 세포질에서는 결정체구조가 나타났으며 핵 근처에서는 2개의 축사 뿌리와 중심체가 관찰되었다. 고환과 저정낭에서 무수히 많은 정자의 단면이 관찰되었다. 횡단면을 형태학적 특징과 구성요소를 토대로 분류·조합해 본바, 6가지 형으로 대별되었고 정자 부위별 횡단면의 특징적인 형태를 관찰할 수 있었다. *F. seoulensis*의 정자는 2편모성이었으며 축사는 9쌍의 미세소관과 1개의 core complex로 이루어져서 전형적인 9 + 1형 구조이었다.

서론

정자형성과정 및 정자의 구조가 매우 복잡함에도 불구하고 전자현미경을 이용하여 각종 흡충류의 정자형성과정 및 정자의 구조에 대하여 많은 연구가 이루어져 왔다. Sato et al.(1967)은 *Paragonimus miyazakii*의 정자형성에 대하여 연구하였고, Burton(1972)은 개구리의 폐흡충인 *Haematoloechus medioplexus*의 정자와 정자분화과정을, Threadgold(1975a & b)는 *Fasciola hepatica*의 웅성생식기를, Grant et al.(1976)은 *Pharyngostomoides procyonis*의 웅성생식기를, Fujino et al.(1977)은 *Eurytrema pancreaticum*과 *Paragonimus ohirai*의 정자 형태 및 생성에 대하여, Jeong et al.(1976)과 정과 임(1984)은 간흡충의 정자형성과정 및 정자의 미세구조에 대하여, Orido(1988)는 *Paragonimus ohirai*의 수

정낭내에 있는 정자의 미세구조에 대하여 연구하였으며 Kitajima et al.(1976), Otubanjo(1980 & 1981), Irie et al.(1983), Awad and Probert(1989) 등은 주혈흡충의 웅성생식기 및 정자의 구조에 대하여 연구한 바 있다.

한편, *Fibricola seoulensis*는 Seo et al.(1964)에 의해 서울에서 잡은 집쥐의 소장에서 처음 발견되어 신종으로 명명된 Diplostomidae과의 흡충으로써 Diplostomidae과 흡충 중 유일하게 성충이 인체에서 발견되었으며 인체감염의 보고와 더불어 많은 연구가 진행되어 왔으나(Seo, 1990) 생식기 미세구조에 대한 연구는 시행된 바 없다. 따라서 이 연구에서는 이 흡충의 고환내 웅성생식세포 및 정자의 구조를 투과전자현미경으로 관찰하고자 하였다.

재료 및 방법

자연감염된 유희목이(*Rhabdophis tigrina*)를 인공소화시킨 후 입체해부현미경 하에서 피낭유충을 분리 수집하였다. 분리 수집한 피낭유충을 2마리의 흰쥐에 각각 100개씩 경구감염시킨 후 4일과

* 논문접수 1993년 7월 6일, 수정재접수 1993년 7월 28일

* 별책 요청 저자

9일에 원취로부터 총체를 회수하였다. 실험감염 원취로부터 회수한 총체를 0.1 M cacodylate buffer (PH 7.4)로 몇 번 씻은 후 2% paraformaldehyde + 2.5% glutaraldehyde (0.1 M cacodylate buffer, PH 7.4) 혼합고정액으로 약 12시간 동안 냉장고정하였다.

고정한 표본들을 0.1 M cacodylate buffer-용액으로 몇 번 씻은 후 1% osmium tetroxide로 실온에서 2시간 동안 후고정하였으며 다시 표본을 buffer-용액으로 씻고 ethanol series(50%, 70%, 80%, 90%, 95%, absolute)에서 탈수하였다. 통상적인 침투, 포매, 중합 등의 과정을 거친 후 ultramicrotome(LKB 2188 Ultratome NOVA, Sweden)으로 준초박절편(1 μm)을 제작하여 toluidine blue로 염색한 후 관찰할 부위를 결정하였으며, 초박절편을 만들어 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색한 후 투과전자현미경(JEM 1200EX-II, JEOL, Japan)으로 관찰하였다.

결 과

1. 생식세포의 초기 발생단계별 구조

정원세포(spermatogonia): 주로 고환의 내측 주변부위에서 발견되었으며 비교적 큰 핵과 상대적으로 적은 세포질을 가지고 있었다. 핵은 타원형 또는 부정형이었고 비교적 고르게 분포하는 염색질을 가지고 있었으며 세포질 내에는 사립체(mitochondria)와 많은 수의 유리 리보솜체(free ribosome)가 존재하였다(Figs. 1 & 2).

정모세포(spermatocytes): 제 1 차 정모세포는 핵의 양이 세포질 보다 조금 많았고 핵은 난형 또는 타원형이었으며 염색질의 양이 비교적 적었다. 세포질 내에는 다수의 사립체와 리보솜체가 존재하였다(Fig. 3). 제 2 차 정모세포는 타원형의 핵을 가지고 있었으며 세포질 내에는 사립체, 과립형질내세망(granular endoplasmic reticulum) 및 미세소관(microtubule) 등이 존재하였다(Fig. 4).

정자세포(spermatids): 초기의 정자세포는 핵에 비하여 세포질의 양이 훨씬 많았고 핵 주위에 사립체들이 다수 분포하고 있었으며 세포질 내에는 사립체, 유리 리보솜체, 골지복합체(Golgi complex) 등이 분포하였다(Fig. 5). 발생이 진전됨에 따라 핵내에 전자밀도가 높은 끈 모양의 염색질이 나타났고, 세포질내에는 결정체(crystalline body) 구조가, 핵 근처에서는 2개의 축사뿌리(rootlet of axoneme)와 중심체 또는 microtubule-organizing center(MTOC)가 나타났으며 이어서 원형질막이 함입되면서 내용물을 둘러싸게 되어 하나의 정자가 형성되었다(Figs. 6, 7 & 8).

2. 정자의 구조

고환의 절단면에서는 종 및 횡으로 절단된 수많은 정자가 관찰되었다. 횡단면으로 여러 부위에서 절단된 정자의 단면을 형태학적 특징 및 구성요소를 토대로 분류 조합해 본 바 다음과 같았다.

1) 하나씩 배열된 미세소관이 외곽을 둘러싸고(cortical singlets) 있고 그 안에 1개의 축사와 핵 및 사립체 등이 분포하는 것, 2) 주위단미세소관(peripheral singlets), 핵, 사립체 및 2개의 축사 등으로 이루어진 것, 3) 주위단미세소관, 사립체, nuclear cylinder 및 2개의 축사 등으로 이루어진 것, 4) 주위단미세소관의 수가 많이 감소하였고, 사립체, nuclear cylinder 및 2개의 축사 등으로 이루어진 것, 5) 축사만 2개 분포하는 것, 6) 주위단미세소관만 있는 것 등이었다(Figs. 9, 10 & 11).

1)의 단면은 직경이 약 0.7 μm이었고, 27개의 피질미세소관(cortical microtubule)이 핵과 사립체 뒤의 주변에 배열되어 있었으며 핵 및 염색질의 덩어리는 직경이 각각 0.29 μm 및 0.18 μm 이었다(Fig. 12). 2)의 단면도 직경이 0.7 μm이었고 34개의 미세소관이 핵과 사립체 뒤(27개) 및 2개의 축사 사이(7개)의 주변에 배열되어 있었으며 핵 및 염색체의 덩어리는 직경이 각각 0.39 μm 및 0.29 μm이었다(Fig. 13). 3)의 단면은 직경이 약 0.55 μm이었고 31개의 미세소관이 사립체 뒤(27개)와 축사 사이(4개)의 주변에 배열되어 있었다(Fig. 14). 4)의 단면은 직경이 약 0.5 μm이었고 16개의 미세소관이 사립체 뒤(12개)와 축사 사이(4개)의 주변에 배열되어 있었다(Fig. 15). 5)의 단면은 직경이 약 0.24 μm이었고 6)의 단면은 미세소관의 수가 일정하지 않았다(Fig. 16). 각 단면에서 관찰된 축사는 core complex, radial links 및 dynein arms를 가진 주위쌍미세소관(peripheral doublets) 등으로 구성되어 있었으며 9쌍의 미세소관과 1개의 core complex로 이루어져 있어 전형적인 9+1형의 구조이었다.

정자의 종단면에서는 core complex를 가운데 두고 2개의 미세소관이 양측에 배열되어 있었고 높은 전자밀도의 염색질 덩어리는 나선형으로 꼬여 있었으며 그 양쪽에 주름진 형태의 핵막이 관찰되었다(Figs. 17 & 18). 저정낭에 있는 성숙 정자의 종단면에서 2 편모성 구조가 잘 관찰되었으며 횡단된 정자 중에서는 축사가 3-4개 있는 비정상적인 것도 관찰되었다(Fig. 19).

고 찰

흡충류 정자의 분화에 대한 연구는 과정이 매우 복잡하기 때문에 어려운 것으로 알려져 있다. 일반적으로 고환의 내벽에 붙어있는 제 1 차 정원체

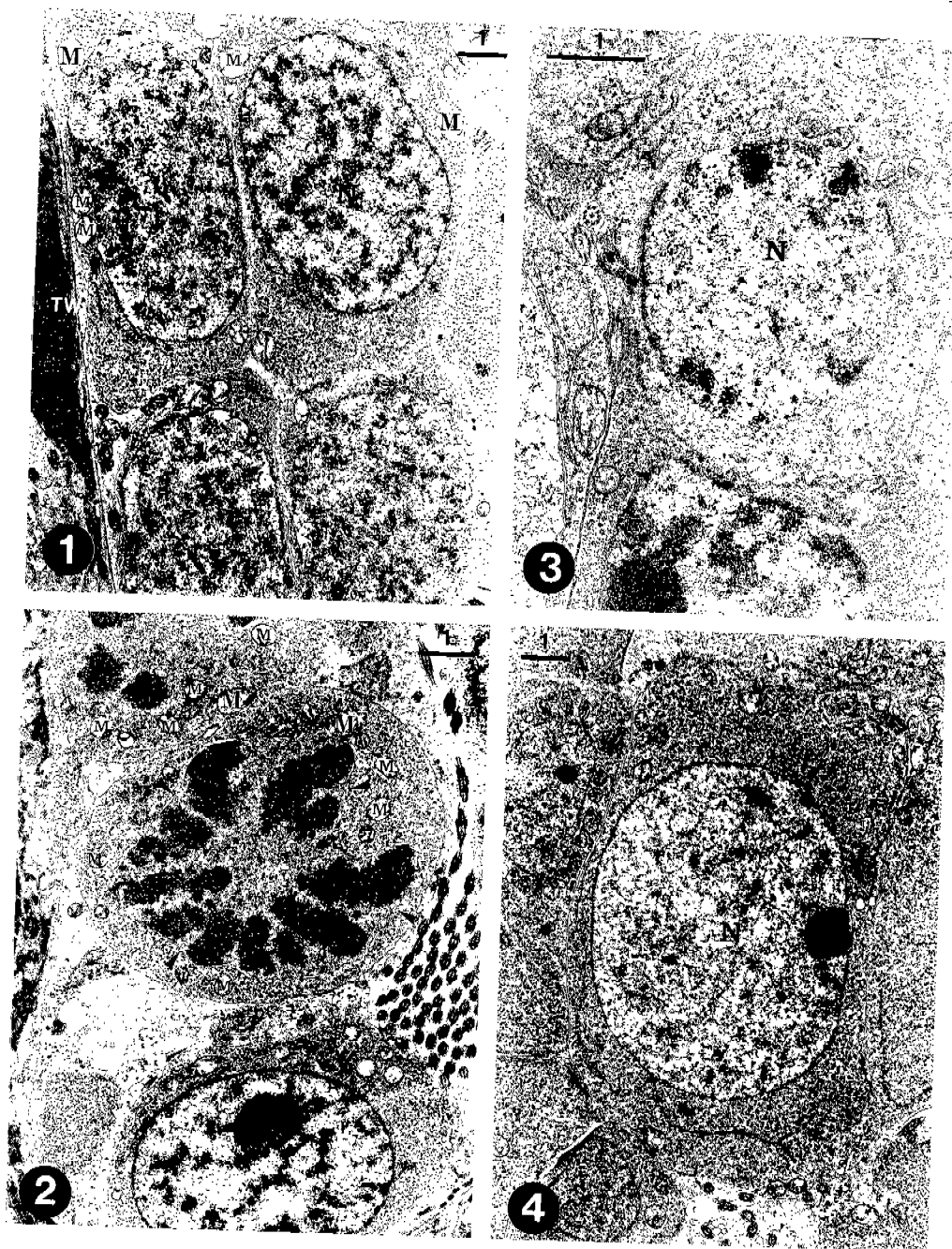


Fig. 1. The spermatogonia at periphery of the testis, which characterized by large nucleus (N) and comparatively little cytoplasm containing mitochondria (M), numerous free ribosomes and sparse rough-surfaced endoplasmic reticulum. $\times 7,500$. **Fig. 2.** A spermatogonium is dividing. Note the dividing chromatin mass, irregular contour of nuclear membrane (arrow heads) and numerous mitochondria (M). $\times 7,500$. **Fig. 3.** The primary spermatocyte showing the oval or elliptical nucleus (N) and cytoplasm with mitochondria and free ribosomes. $\times 11,250$. **Fig. 4.** The secondary spermatocyte showing the oval-shaped nucleus (N) with chromatin patches and the cytoplasm containing mitochondria, free ribosomes, rough-surfaced endoplasmic reticulum and microtubules. $\times 7,500$.

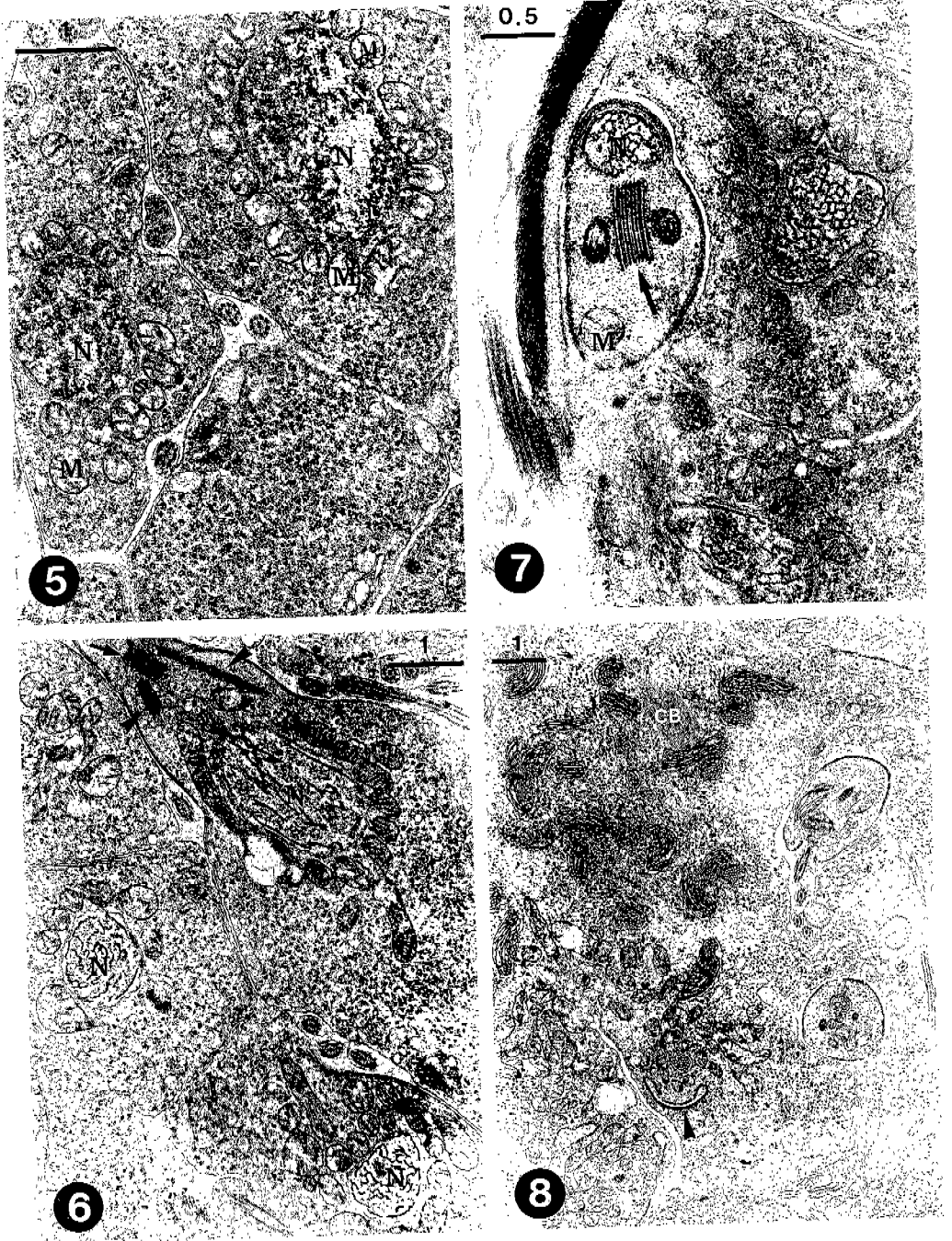
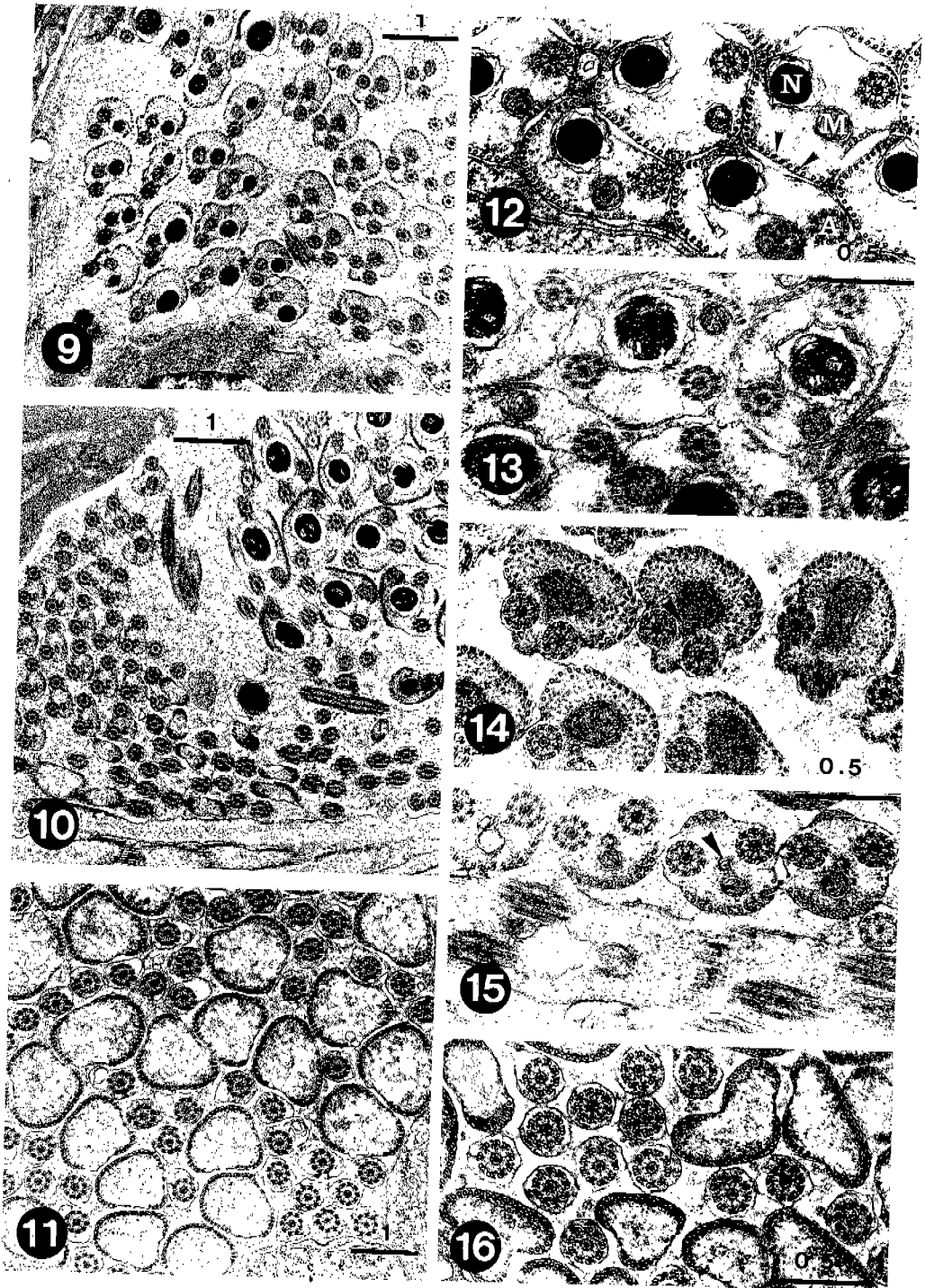
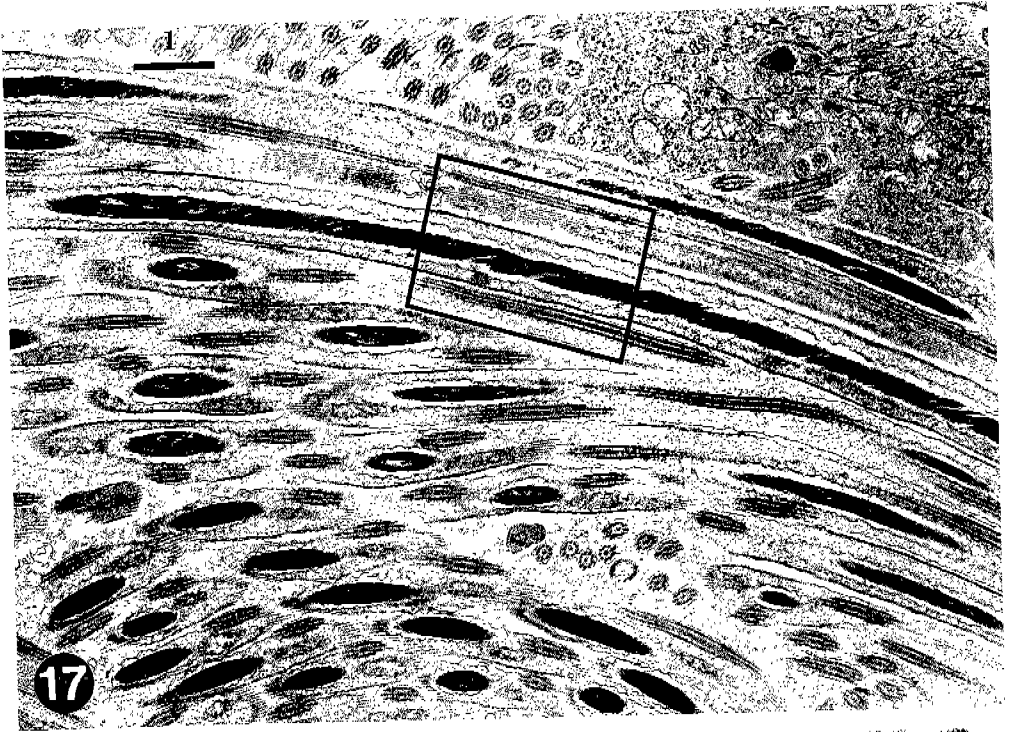


Fig. 5. The spermatids at earliest stage of development. Note the numerous mitochondria (M) encircled the nucleus (N). $\times 15,000$. **Fig. 6.** The spermatids contain the nucleus (N) with the chromatins of electron-dense strands, a pair of rootlets of axoneme (arrow heads) and a microtubule-organizing center (MTOC: arrow mark). $\times 11,250$. **Fig. 7.** The spermatid enclosed by plasma membrane showing nucleus (N), mitochondria (M) and MTOC (arrow mark). $\times 22,000$. **Fig. 8.** The spermatids contained the non-condensed nuclei, the head portion of spermatozoa and a crystalline body. $\times 7,500$.



Figs. 9-16. The various cross sectional views of spermatozoa. **Figs. 12 & 13.** The head portion with the electron-dense nucleus (N) and mitochondria (M). **Figs. 14 & 15.** The middle portion with the nuclear cylinder (arrow head) and mitochondria. **Fig. 16.** The posterior portion showing the biflagella and the 9+1 arrangement of axonemes. $\times 30,000$.



17



18



19

Fig. 17. The longitudinal sections of the spermatozoa. $\times 10,000$. **Fig. 18.** The magnification of the boxed area in Fig. 17. Note the electron-dense chromatin (C) twisted in helical shape and the ruffled nuclear envelope (arrow heads). $\times 27,500$. **Fig. 19.** The spermatozoa in the seminal vesicle. Note the spermatozoa of 2 flagella type (arrow mark) and the abnormal ones with 3-4 axonemes (arrow heads). $\times 10,000$.

포(primary spermatogonia)로부터 시작하여 제 2 차 정원세포, 제 1 차 정모세포(primary spermatocyte), 제 2 차 정모세포, 정자세포를 거쳐 결국 32개의 정자가 형성되는 과정을 밝게 되는데 각 과정의 세포들은 크기 및 구성요소의 분포 등에 있어서 독특한 형태학적 특징을 가지므로 전자현미경으로 구분이 가능하다고 하였다(Mehlhorn, 1988). Awad and Probert(1989)는 *Schistosoma margrebowiei*의 정자 생성에 관한 연구에서 각 단계 생식세포의 형태에 대하여 상술하였고, Grant et al.(1976)은 *Pharyngostomoides procyonis*의 정자세포에서 정자로 발육되는 과정을 면밀히 관찰한 바 있다. 특히, Grant et al. (1976)은 정자세포에서 rootlet과 축사 사이에 나타나는 구조물을 MTOC (microtubule organizing center)라고 칭하면서 Silveira and Porter(1964)의 중심소체(centriole), Burton (1972)의 centriole-like body, Hitchen and Butler(1973)의 condensation center 등과 동일한 것이라고 하였으며 basal body와 밀접한 관계가 있다는 측면에서 MTOC가 축사의 주위미세소관 형성에 관여할 것이라고 가정하였다. 이 연구에서는 비록 고환내 존재하는 각 단계 생식세포의 형태학인 기술에 머물고 말았지만 관찰된 소견들을 종합해 볼 때, *F. seoulensis*의 고환내 생식세포도 다른 흡충류에서 관찰된 것과 거의 같은 형태 및 구성요소로 이루어져 있음을 확인하였다.

흡충류 정자의 형태에 관하여 Nez and Short (1957)는 *S. douthitti*를, Burton(1967 & 1972)은 *H. medioplexus*를, Gressen and Perry (1961)는 *F. hepatica*를, Hendelberg (1962)는 *D. dendriticum*과 *F. hepatica*를, Sato et al. (1967)은 *P. miyazakii*를, Grant et al.(1976)은 *P. procyonis*를, Kitajima et al.(1976)는 *S. mansoni*를, Fujino et al.(1977)은 *P. ohirai*와 *E. pancreaticum*을, 정·임(1984)은 *C. sinensis*를, Orido(1988)는 *P. ohirai*를 각각 연구한 바 있다. Burton(1972)은 *H. medioplexus*의 정자를 광학현미경으로 관찰하여 첨체(acrosome), 두부(head portion), 미부(tail portion)로 나눈 후 미부를 다시 중편(middle piece)과 말단부(terminal piece)로 나누어서 관찰하였고, Fujino et al.(1977)은 *P. ohirai*와 *E. pancreaticum*의 정자를 주사전자현미경으로 관찰한 후 좁은 전단(anterior tip), 다소 굵은 두부, 조금 납작한 꼬리 등으로 나누어서 관찰하였다.

한편, Orido(1988)는 *P. ohirai*의 정자를 광학현미경, 주사 및 투과전자현미경 등으로 관찰한 후 anterior region(AR), first mitochondrial region(FMR), intermediate region(IR), second mitochondrial region(SMR), posterior

nuclear region(PNR), tail region(TR) 등 6개 부위로 나누었으며 살아있는 정자는 AR 과 FMR에서 파동운동이, IR에서는 진동운동이 일어나며 PNR과 TR에서는 움집임이 없다고 하였다. 그리고 AR과 FMR을 정자의 두부로, IR을 중간부위로, SMR과 PNR 및 TR을 후미부로 분류하여 횡단면의 형태학적 특징을 관찰하였는데 이 Orido(1988)의 연구소견은 흡충류 정자의 일반적인 소견과 다르며 같은 *P. ohirai*로 연구한 Fujino et al. (1977)의 소견과도 많은 차이가 있다. 일반적으로 흡충류 정자의 두부에는 첨체는 없고 전자밀도가 높은 염색질 덩어리를 가진 핵을 보유하고 있으며 하나 또는 두개의 편모성 축사가 존재하는 것으로 알려져 있는데(Mehlhorn, 1988) 이는 Fujino et al.(1977)의 연구에서도 동일한 소견이었다. 본 연구에서는 정자를 분리하여 부위별로 관찰하지 않았기 때문에 체계화시킬 수는 없었지만 고환에서 관찰되는 정자의 횡단면을 형태 및 구성요소를 토대로 하여 나누었을 때, 6가지 형으로 대별되었고 정자 부위별 횡단면의 형태학적 특징을 파악할 수 있었다.

섬모나 편모의 횡단면에 나타나는 축사는 일반적으로 9쌍의 외곽 미세소관(peripheral microtubule)과 core complex(central filament)로 이루어 지는데 이들의 구성을 식으로 나타내어 축사의 형태를 구분하고 있다. 기생성 편형동물들의 정자는 1 편모성 또는 2 편모성으로서 9 + 0, 9 + 1 또는 9 + 2형의 축사를 가지는데 흡충류의 경우 거의 대부분이 9 + 1형의 축사를 가지는 것으로 알려져 있다(Rees, 1979; Robinson and Halton, 1982; Justine and Mattei, 1988; Orido, 1988). 이 연구에서 관찰된 *F. seoulensis* 정자의 축사도 전형적인 9+1형이었으며 core complex, radial links, dynein arms을 가진 주위 쌍미세소관 등으로 이루어져 있었다.

참고문헌

정계현, 임한중 (1984) 간흡충의 미세구조에 관한 연구. V. 정자의 미세구조. 기생충학잡지 **22**: 30-36.
 Awad AHH, Probert AJ (1989) Transmission and scanning electron microscopy of the male reproductive system of *Schistosoma margrebowiei* Le Roux, 1933. *J Helminthol* **63**: 197-205.
 Burton PR (1967) Fine structure of the unique central region of the axial unit of lung fluke spermatozoa. *J Ultra Res* **19**: 166-172.
 Burton PR (1972) Fine structure of the reproductive system of a frog lung fluke. III. The spermatozoon and its differentiation. *J*

- Parasit* **58**(1): 68-83.
- Fujino T, Ishii Y, Mori T (1977) Ultrastructural studies on the spermatozoa and spermatogenesis in *Paragonimus* and *Eurytrema* (Trematoda: Digenea). *Jap J Parasitol* **26**: 240-255 (in Japanese).
- Grant WC, Harkema R, Muse KE (1976) Ultrastructure of *Pharyngostomoides procyonis* Harkema 1942 (Diplostomatidae). I. Observations on the male reproductive system. *J Parasit* **62**: 39-49.
- Gresson RAR, Perry MM (1961) Electron microscope studies of spermatogenesis in *Fasciola hepatica* L. *Exp Cell Res* **22**: 1-8.
- Hendelberg J (1962) Paired flagella and nucleus migration in the spermiogenesis of *Dicrocoelium* and *Fasciola* (Digenea, Trematoda). *Zool Bdr Uppsala* **35**: 569-587.
- Irie Y, Basch PF, Beach N (1983) Reproductive ultrastructure of adult *Schistosoma mansoni* grown *in vitro*. *J Parasit* **69**: 559-566.
- Jeong KH, Rim HJ, Yang HY, et al. (1976) A morphological study on spermatogenesis in the liver fluke, *Clonorchis sinensis*. *Korean J Parasit* **14**: 123-132.
- Justine JL, Mattei X (1988) Bending of 9 + "1" axonemes of flatworm spermatozoa in hypotonic media: An experimental study. *J Ultra Mole Struc Res* **100**: 31-38.
- Kitajima EW, Paraense WL, Correa LR (1976) The fine structure of *Schistosoma mansoni* sperm (Trematoda: Digenea). *J Parasit* **62**: 215-221.
- Mehlhorn H (1988) Parasitology in focus: Fact and trend. p312-367, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo
- Nez MM, Short RB (1957) Gametogenesis in *Schistosoma douthitti* (Cort) (Schistosomatidae: Trematoda). *J Parasit* **43**: 167-182.
- Orido Y (1988) Ultrastructure of spermatozoa of the lung fluke, *Paragonimus ohirai* (Trematoda: Troglotrematidae), in the seminal receptacle. *J Morphol* **196**: 333-343.
- Otubanjo OA (1980) *Schistosoma mansoni*: the ultrastructure of the ducts of the male reproductive system. *Parasitology* **81**: 565-571.
- Otubanjo OA (1981) *Schistosoma mansoni*: the sustentacular cells of the testes. *Parasitology* **82**: 125-130.
- Rees FG (1979) The ultrastructure of the spermatozoon and spermiogenesis in *Cryptocotyle lingua* (Digenea: Heterophyidae). *Int J Parasitol* **9**: 405-419.
- Robinson RD, Halton DW (1982) Fine structural observations on spermatogenesis in *Corrigia vitta* (Trematoda: Dicrocoeliidae). *Z Parasitenkd* **68**: 53-72.
- Sato M, Oh M, Sakoda K (1967) Electron microscopic study of spermatogenesis in the lung fluke (*Paragonimus miyazakii*). *Z Zellforsch* **77**: 232-243.
- Seo BS (1990) *Fibricola seoulensis* Seo, Rim and Lee, 1964 (Trematoda) and fibricoliasis in man. *Seoul J Med* **31**: 61-96.
- Seo BS, Rim HJ, Lee CW (1964) Studies on the parasitic helminths of Korea I. Trematodes of rodents. *Korean J Parasit* **2**: 20-26.
- Silveira M, Porter R (1964) The spermatozoides of flatworm and their microtubular systems. *Protoplasm* **59**: 240-265.
- Threadgold LT (1975a) Electron microscope studies of *Fasciola hepatica*. IV. The fine structure of the prostate gland. *Exp Parasitol* **37**: 117-124.
- Threadgold LT (1975b) *Fasciola hepatica*: the ultrastructure of the epithelium of the seminal vesicle, the ejaculatory duct and cirrus. *Parasitology* **71**: 437-443.

=Abstract=

Transmission electron microscopic ultrastructures of the male germinal cells of
Fibricola seoulensis

Woon-Mok Sohn^{1)*} and Soon-Hyung Lee²⁾

Department of Parasitology¹⁾, College of Medicine, Inje University, Pusan 614-735, Department of Parasitology²⁾ and Institute of Endemic Diseases, Seoul National University College of Medicine, Seoul 110-799, Korea

A transmission electron microscopic study was performed to observe the ultrastructures of the male germinal cells and spermatozoa of *Fibricola seoulensis*. Spermatogonia were found in the periphery of the testis and characterized by large nuclei and comparatively little cytoplasm. Spermatocytes contained an oval to spherical nucleus. Their nuclear volume was little larger in comparative to that of cytoplasm, and the chromatin was comparatively little. The early spermatids were characterized by a great amount of cytoplasm, and numerous mitochondria encircled the nucleus. In a more advanced spermatids the electron-dense strands of chromatin appeared in the nucleus, and a pair of rootlet of the axoneme and a microtubule-organizing center (MTOC) were observed near the nucleus. The sectioned spermatozoa were found in the testis and the seminal vesicle. Their cross sectional views were divided into 6 types when they were distinguished on the basis of the morphology and components. The spermatozoa of *F. seoulensis* showed two flagella of 9+1 type axoneme.

Key words: *Fibricola seoulensis*, male germinal cells, spermatozoa, TEM, ultrastructures

[**Korean J. Parasit., 31(3): 183-191, September 1993**]

*Corresponding author